



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0036408
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 06월 05일
Date of Application JUN 05, 2003

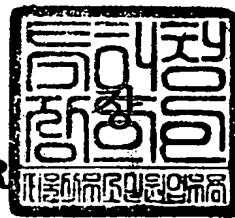
출원인 : 한미약품 주식회사
Applicant(s) HANMI PHARM. IND. CO., LTD.



2003 년 07 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER





919990003665



10111010000000000000



0001267000

| 방식 심사관 | 담 당 | 심 사 관 |
|-----------|-----|-------|
| | | |

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2003.06.05

【발명의 국문명칭】 생체내 지속성이 증가된 생리활성 폴리펩타이드 결합체

【발명의 영문명칭】 PHYSIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE CONJUGATE HAVING
IMPROVED IN VIVO DURABILITY

【출원인】

【명칭】 한미약품 주식회사

【출원인코드】 1-1998-004411-2

【대리인】

【성명】 이현실

【대리인코드】 9-1999-000366-5

【포괄위임등록번호】 1999-056327-8

【대리인】

【성명】 장성구

【대리인코드】 9-1998-000514-8

【포괄위임등록번호】 1999-023919-6

【발명자】

【성명의 국문표기】 김영민

【성명의 영문표기】 KIM,Young Min

【주민등록번호】 690813-1148928

【우편번호】 449-900

【주소】 경기도 용인시 기흥읍 고매리 877 매화마을 우남드림밸리 102동 803
호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김대진

【성명의 영문표기】 KIM,Dae Jin

【주민등록번호】 741128-1066712

【우편번호】 137-049

【주소】 서울특별시 서초구 반포본동 구반포아파트 28동 402호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 배성민

【성명의 영문표기】 BAE,Sung Min

【주민등록번호】 730529-1109410

【우편번호】 151-054

【주소】 서울특별시 관악구 봉천4동 1587-8 303호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 임창기

【성명의 영문표기】 LIM,Chang Ki

【주민등록번호】 700104-1156311

【우편번호】 463-110

【주소】 경기도 성남시 분당구 불정동 한진아파트 803-1401

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권세창

【성명의 영문표기】 KWON,Se Chang

【주민등록번호】 630620-1024818

【우편번호】 143-210

【주소】 서울특별시 광진구 광장동 현대8차 802동 2205호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이관순

【성명의 영문표기】 LEE, Gwan Sun

【주민등록번호】 600110-1471553

【우편번호】 138-130

【주소】 서울특별시 송파구 오금동 우창아파트 3동 404호

【국적】 KR

【우선권주장】

【출원국명】 KR

【출원종류】 특허

【출원번호】 10-2003-0015744

【출원일자】 2003.03.13

【증명서류】 첨부

【심사청구】 청구

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다.

대리인

이현실 (인)

대리인

장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 47 면 47,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 33 항 1,165,000 원

【합계】 1,267,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

2. 기타첨부서류[우선권증명서류{2003년 3월 13일자로 특허청에 기재
출된 것을 원용함}_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 생리활성 지속기간이 연장된 단백질 결합체에 관한 것으로, 구체적으로, 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 서로 공유결합으로 결합되어 있으며, 상기 생리활성 폴리펩타이드의 지속성이 증가된 단백질 결합체 및 그 이용에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 결합체는 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 활성이 비교적 높게 유지되고 혈중 반감기가 현저히 증가되며, 면역반응 유발의 위험이 적어, 다양한 폴리펩타이드 약물의 지속형 제제 개발에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 8

【명세서】

【발명의 명칭】

생체내 지속성이 증가된 생리활성 폴리펩타이드 결합체 {PHYSIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE CONJUGATE HAVING IMPROVED IN VIVO DURABILITY}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 커플링 반응 후 생성된 인간 성장호르몬-폴리에틸렌 글리콜-면역 글로불린(hGH-PEG-IgG) 결합체의 크로마토그래피 결과이고,
- <2> 도 2는 커플링 반응 후 생성된 hGH-PEG-IgG 결합체를 확인하기 위한 전기영동(SDS-PAGE) 결과이고,
- <3> 도 3은 커플링 반응 후 생성된 인터페론-폴리에틸렌 글리콜-면역 글로불린(IFN-PEG-IgG) 결합체를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고,
- <4> 도 4는 hGH-PEG-IgG를 DDT로 환원시켜 IgG의 경쇄 및 중쇄에 각각 커플링된 hGH를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고,
- <5> 도 5는 hGH-PEG-IgG 결합체의 질량 분석 결과이고,
- <6> 도 6은 hGH-PEG-IgG 결합체가 PEG-hGH에 비하여 우수한 혈중 안정성을 나타냄을 보여주는 약물동력학 그래프이고,
- <7> 도 7은 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린과 결합시키지 않은 적혈구 생성인자(erythropoietin; EPO) 및 고 당쇄화를 통해 안정성을 향상시킨 EPO와 대비하였을 때, EPO-PEG-IgG 결합체가 보다 증가된 혈중 반감기를 갖는 것을 보여주는

약물동력학 그래프이고,

<8> 도 8은 hGH-PEG-IgG 결합체의 생체내 활성 분석을 위해 투여 후 시간 경과에 따른 래트의 몸무게 변화를 나타낸 그래프이고,

<9> (도면에 표시된 그룹 1 내지 5는 순서대로 투여량이 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 인 용매 대조군, 천연형 인간성장호르몬, hGH-PEG, hGH-PEG-IgG 결합체와 투여량이 10 $\mu\text{g}/\text{day}$ 인 hGH-PEG-IgG 결합체를 나타낸다)

<10> 도 9는 과립구 콜로니자극인자(G-CSF)-PEG-IgG 결합체의 생체내 활성 분석을 위해 투여 후 시간 경과에 따른 호중구(Neutrophil) 개체수 변화를 나타낸 그래프이다.

<11> (도면에 표시된 그룹 1 내지 5는 순서대로 무처리군, 용매대조군, 천연형 G-CSF, 20 K PEG-G-CSF 및 ^{17}S -G-CSF-PEG-IgG 결합체를 나타낸다)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 서로 공유결합으로 연결되고, 생리활성 지속기간이 천연형에 비해 연장된 단백질 결합체 및 그 이용에 관한 것이다.

<13>

폴리펩타이드는 일반적으로 안정성이 낮아 쉽게 변성되고 혈액 내의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 신장이나 간을 통해 쉽게 제거되기 때문에, 약리성분으로 폴리펩타이드를 포함하는 단백질 의약품의 혈중 농도 및 역가를 유지하기 위해서는 단백질 약물을 환자에게 자주 투여할 필요가 있다. 그러나, 대부분 주사제 형태로 환자에게 투여되는 단백질 의약품의 경우, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 유지하기 위해 자주 주사를 놓는 것은 환자에게 엄청난 고통을 야기하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해, 단백질 약물의 혈중 안정성을 증가시키고 혈중 약물 농도를 오랫동안 높게 지속시켜 약효를 극대화하려는 노력이 계속되어 왔다. 이러한 단백질 약물의 지속성 제제는 단백질 약물의 안정성을 높이는 동시에 약물 자체의 역가가 충분히 높게 유지되어야 하고 환자에게 면역반응을 유발하지 않아야 한다.

<14>

단백질을 안정화시키고 프로테아제 접촉 및 신장 소실을 억제하기 위한 방법으로, 종래에는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol: PEG)과 같이 용해도가 높은 고분자를 단백질 약물 표면에 화학적으로 부가시키는 방법이 사용되어 왔다. PEG는 목적 단백질의 특정 부위 또는 다양한 부위에 비특이적으로 결합하여 용해도를 높임으로써 단백질을 안정화시키고, 단백질의 가수분해를 방지하는 데에 효과가 있으며 특별한 부작용도 일으키지 않는 것으로 알려져 있다(Sada 등, *J. Fermentation Bioengineering*, 1991, 71: 137-139). 그러나, PEG를 결합시키는 경우에 단백질의 안정성은 증가할 수 있지만 생리활성 단백질의 역가가 현저히 낮아

지고, PEG의 분자량이 증가할수록 단백질과의 반응성이 낮아져 수율이 감소하는 문제가 있다.

<15> 최근에는, PEG의 양쪽 말단에 동일한 단백질 약물을 결합시킨 이중체를 만들어 활성 증가를 꾀하거나(미국 특허 제5,738,846호), 서로 다른 종류의 단백질 약물을 PEG의 양쪽 말단에 결합시켜 동시에 2가지 활성을 나타내는 단백질(국제출원 공개 WO 92/16221)도 개발되었지만, 이들은 단백질 약물의 활성 지속 면에서는 뚜렷한 효과를 보이지 못하였다.

<16> 한편, 킨스틀러 등(Kinstler *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1995, 12(12): 1883-1888)은 과립구 콜로니자극인자(G-CSF)와 인간 알부민을 PEG로 결합시킨 융합 단백질이 증가된 안정성을 보인다고 보고하였다. 그러나, G-CSF-PEG-알부민 구조를 갖는 상기 문헌의 변형된 약물은 체내 잔류시간이 천연형 약물을 단독 투여한 경우에 비해 약 4배 증가하는데 불과하고, 혈중 반감기 증가가 미미하여 단백질 약물의 효과적인 지속성 제제로서 실용화되지 못하고 있다.

<17> 생리활성 단백질의 생체내 안정성을 높이는 또 다른 방법으로서, 유전자 재조합에 의해 혈중 안정성이 높은 단백질 유전자와 생리활성 단백질 유전자를 연결한 후, 상기 재조합 유전자로 형질전환된 동물세포 등을 배양하여 융합 단백질을 생산하는 방법이 개발되어 있다. 예를 들어, 현재까지 단백질의 안정성 증가에 가장 효과가 높은 것으로 알려져 있는 알부민 또는 그 단편을 유전자 재조합에 의해 목적하는 생리활성 단백질에 결합시켜 생산한 융합 단백질이 보고되어 있다(국제출

원공개WO 93/15199 및 WO 93/15200, 유럽특허공개 EP 413,622). 휴먼 게놈 사이언스(Human Genome Science)사가 효모에서 생산한 인터페론 알파와 알부민의 융합 단백질(제품명: Albuferon™)은 원숭이에서 인터페론의 반감기를 5시간에서 93시간으로 증가시켰지만, 변형되지 않은 인터페론에 비해 생체 활성도가 5% 미만으로 현저히 감소하는 문제가 있다(Osborn *et al.*, *J. Phar. Exp. Ther.*, 2002, 303(2) 540-548).

<18>

한편, 면역 글로불린을 이용한 융합 단백질로서, 인터페론(한국특허공개 제2003-9464호) 또는 인터루킨-4 수용체, 인터루킨-7 수용체, 적혈구생성인자 수용체(한국특허등록 제249,572호)를 면역 글로불린의 중쇄 불변영역 이량체(Fc)와 융합된 형태로 포유동물에서 발현시키는 것이 알려져 있으며, 국제특허공개 제01/03737호에는 사이토카인 또는 성장인자를 올리고펩타이드 링커를 통해 면역 글로불린의 단편에 결합시킨 융합 단백질이 개시되어 있다. 그러나, 유전자 재조합에 의한 융합 단백질 생산방법은 융합 파트너로서 사용될 수 있는 면역 글로불린의 분자량이 제한되고, 적합한 발현 시스템 확립이 어려우며, 생산된 융합 단백질에서 나타나는 당쇄화 양상이 천연형 폴리펩타이드 약물과는 상이할수 있고, 융합 부위에 새롭게 형성된 단백질 서열이 면역 반응을 유발할 가능성을 갖는 등의 문제점을 갖고 있다.

<19>

면역 글로불린을 이용하되 유전자 재조합에 의하지 않은 방법으로서, 미국 특허 제5,045,312호는 교차결합제를 이용하여 인간 성장호르몬에 소 혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA) 또는 쥐의 면역 글로불린을 결합시킴으로써 변

형되지 않은 성장호르몬에 비해 성장호르몬의 활성을 증가시킬 수 있음을 개시하고 있다. 그러나, 상기 특허에서는 교차결합제로서 카보디이미드(carbodiimide) 또는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)와 같은 저분자량의 화학물질만을 개시하고 있을 뿐이다. 이러한 저분자량의 교차결합제를 사용할 경우 비특이적 결합으로 인해 균질한 조성물을 얻기 어려우며, 생체내 독성을 갖는 문제가 있다. 또한, 상기 특허에서는 성장호르몬의 화학적 커플링에 의해 그 활성을 증가시킬 수 있음을 보여줄 뿐이어서, 다양한 종류의 폴리펩타이드 약물에 대해서는 활성 증가의 효과가 나타날 것인지조차 불명확하며, 지속기간 및 혈중 반감기 증가와 같은 단백질의 안정성과의 관련성에 대해서는 전혀 인식조차 못하고 있다.

<20>

이처럼 생리활성 단백질에 고분자를 결합시키는 다양한 방법이 시도되어 왔지만, 기존의 방법들은 폴리펩타이드의 안정성을 높이면 활성이 현저히 감소하거나, 안정성과는 무관하게 활성만을 증가시키는 것이어서, 변형에 의한 단백질 약물의 활성 감소를 최소화하고 안정성 향상을 동시에 달성하는 방법의 개발이 여전히 요구되어 왔다.

<21>

이에, 본 발명자들은 종래에는 동시에 달성하기 어려운 것으로 여겨져 왔던 활성 감소 최소화와 안정성 증가를 동시에 이룰 수 있는 지속성 단백질 약물 제제를 개발하기 위해 연구를 계속한 결과, 면역 글로불린, 비펩타이드성 중합체 및 생리활성 폴리펩타이드를 공유결합으로 연결한 단백질 결합체가 생리 활성 단백질의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키고, 공지의 단백질 약물에 비해 높은 역가를 유

지함을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 본 발명의 목적은 생리 활성 폴리펩타이드의 혈중 반감기를 증가시키고 생리 활성을 개선시키면서도 면역 반응 유발의 위험이 없는, 단백질 결합체를 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 다른 목적은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 단백질 결합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

<24> 본 발명의 또 다른 목적은 안정성이 증가된 지속성 단백질 약물 제제를 제공하는 것이다.

<25> 본 발명의 또 다른 목적은 폴리펩타이드의 생리활성 감소를 최소화하는 동시에 혈중 반감기를 증가시켜 안정성 및 생리활성의 지속성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

<26> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 서로 공유결합으로 연결되어 있으며, 상기 생리활성 폴리펩타이드의 활성 지속 시간이 증가된 단백질 결합체를 제공한다.

<27> 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 양 말단에 반응기를 갖는

비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린을 반응시켜 이들을 공유결합으로 연결하는 단계; 및 (b) 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 생체내 지속성이 증가된 단백질 결합체 제조방법을 제공한다.

<28> 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린을 포함하고 이들이 상호 공유결합으로 연결된 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 지속성 단백질 약물 제제를 제공한다.

<29> 상기 또 다른 하나의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린을 공유결합으로 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 지속성을 향상시키는 방법을 제공한다.

<30> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<31> 본 발명에서 "생리활성 폴리펩타이드", "생리활성 단백질", "활성 단백질" 또는 "단백질 약물"이란 생체내에서 생리적 현상에 길항작용을 나타내는 폴리펩타이드 또는 단백질을 의미하는 용어로서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

<32> 본 발명에서 "단백질 결합체" 또는 "결합체"라 함은 하나 이상의 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 하나 이상의 비펩타이드성 중합체 및 하나 이상의 면역 글로불린을 포함하고, 이들 구성요소가 공유결합으로 상호 연결되어

있는 것을 가리킨다. 또한, 3가지 성분을 필수적으로 포함하는 본 발명의 상기 "결합체"와 구별하기 위하여, 2 종류의 물질 분자만이 공유결합으로 연결된 구조물은 "연결체"로 표시한다.

<33> 본 발명에서 "비펩타이드성 중합체"는 반복 단위가 2개 이상 결합된 중합체를 의미하며, 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합으로 연결되지 않는다.

<34> 본 발명의 다른 측면으로서, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린을 공유결합으로 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 지속성을 향상시키는 방법을 제공한다.

<35> 상기 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 지속성 향상은 본 발명의 정의에 따른 단백질 결합체를 형성함으로써 달성된다.

<36> 상기에서, 본 발명의 단백질 결합체는 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린과 공유결합으로 연결된 [생리활성 폴리펩타이드-비펩타이드성 중합체-면역 글로불린]의 조합을 하나 이상 포함한다. 즉, 하나의 면역 글로불린에, 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체의 연결체 하나 이상이 공유결합으로 연결됨으로써, 면역 글로불린을 매개체로 하여 생리활성 폴리펩타이드 단량체, 이량체 혹은 다량체를 형성할 수 있으며, 이를 통해 활성 및 안정성 증가를 보다 효과적으로 달성할 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체에 있어 생리활성 폴리펩타이드와 면역 글로불린은 1:1 내지

10:1, 바람직하게는 1:1 내지 4:1의 몰비로 결합될 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체에서는 같거나 다른 종류의 비펩타이드성 중합체가 2개 이상 연속적으로 연결되어 하나의 비펩타이드성 중합체로 작용할 수도 있다.

<37> 본 발명의 단백질 결합체에 있어, 면역 글로불린의 결합 부위는 불변영역 및 가변영역에 존재하는 아미노산 잔기의 유리 반응기 중 하나 이상을 포함하며, 특히, 면역 글로불린 가변 영역의 아미노 말단, 라이신의 아미노 잔기, 히스티딘의 아미노 잔기 또는 유리 시스테인 잔기에서 비펩타이드성 중합체의 말단 반응기와 공유결합하는 것이 바람직하다.

<38> 상기 면역 글로불린은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되며, IgG의 경우 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 모든 서브타입이 이용될 수 있다. 본 발명의 단백질 결합체가 인간에게 적용되는 지속성 제제로 이용되기 위해서는 면역 반응을 유발하지 않도록 상기 면역 글로불린이 인간 면역 글로불린인 것이 바람직하다.

<39> 본 발명의 단백질 결합체를 구성하는 상기 면역 글로불린은 인간 혈액으로부터 정제한 천연형 단백질 또는 유전공학적으로 생산된 재조합 단백질 중 어느 것이나 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 단백질 결합체를 구성하는 면역 글로불린은 본 발명의 목적과 관련된 기능, 구조 또는 안정성에 있어서 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 결합에 중요하다고 알려진 영역(예를 들면, IgG의 경우 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322, 327 내지 331번째 아미노산 영역)을 포함한, 일부 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 치환되거나 고 당쇄화된

유도체 또는 일부 아미노산 서열이 추가되거나 결실된 것도 사용할 수 있다.

<40>

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시나미드(succinamide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서, 석시나미드 유도체로는 석시니미딜 프로피오네이트, 하이드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있다. 특히, 상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 경우, 비특이적 반응을 최소화하고, 비펩타이드성 중합체를 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린의 아미노 말단과 각각 결합시키는 데 효과적이다. 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물을 아미드 결합을 갖는 동일한 중합체보다 훨씬 안정적이다.

<41>

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기는 서로 같거나 다를 수 있다. 예를 들어, 한쪽 말단에는 말레이미드 그룹을, 다른 쪽 말단에는 알데히드 또는 프로피온 알데히드 그룹을 가질 수 있다. 양쪽 말단에 하이드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 비펩타이드성 중합체로 이용하는 경우에는, 공지의 화학반응에 의해 상기 하이드록시 기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 본 발명의 단백질 결합체를 제조할 수 있다.

<42>

생리활성 폴리펩타이드와 면역 글로불린이 비펩타이드성 중합체를 매개로 연결되는 경우에는, 상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 상기 면역 글로불린과 상기 생리활성 폴리펩타이드의 아미노 말단, 라이신 잔기, 히스티딘 잔기 또는

시스테인 잔기의 반응기와 결합될 수 있다.

<43>

본 발명의 단백질 결합체의 구성성분으로서 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리비닐 알콜, 폴리스카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르 등과 같은 수용성 중합체, PLGA(poly Lactic-Glycolic Acid) 등과 같은 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들이 둘 이상 연결되어 있는 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 당해 분야에 이미 알려진 이들의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

<44>

종래 알려진 바와 같이 생리 활성 폴리펩타이드와 리간드 단백질이 올리고펩타이드를 매개로 하여 연결되는 경우, 그 연결부위에 의하여 새롭게 형성되는 단백질 서열이 면역반응을 유발시킬 위험이 있으며, 연결되는 단백질들의 결합 방향이 N-말단과 C-말단의 결합으로만 제한되었던 반면, 본 발명의 단백질 결합체는 생체적합성을 갖는 비펩타이드성 중합체에 의하여 매개되기 때문에, 독성이나 면역반응 유발과 같은 부작용이 없고, 생리활성 폴리펩타이드와 면역 글로불린의 결합 방향성의 제한 없이 N-말단과 N-말단의 결합 등이 가능하므로 다양한 단백질 결합체를 제공할 수 있다.

<45>

또한, 종래 유전자 재조합에 의한 면역 글로불린과 활성 단백질의 직접적 융합 방법은 융합 파트너로 사용될 수 있는 면역 글로불린의 분자량이 제한되고, 적

합한 발현 시스템을 확립하기 어려워 중쇄 불변영역 이량체 등 면역 글로불린의 일부만을 이용할 수 있었던 데 반해, 본 발명의 단백질 결합체에서는 그러한 제한이 없어 보다 높은 지속성 및 안정성을 달성할 수 있으며, 세포 배양에 따른 활성 단백질의 천연형과 상이한 당쇄화 문제 등이 없으므로 폴리펩타이드의 활성 유지 면에서도 바람직하다. 한편, 카보다이미드나 글루타르알데히드와 같은 저분자량의 화학적 결합제를 사용하는 경우에는, 상기 화학적 결합제가 단백질의 여러 부위에 동시에 결합하여 단백질을 변성시키거나, 비특이적 결합으로 결합위치의 조절을 곤란하게 하거나, 결합된 단백질의 정제를 어렵게 하는 문제점이 있다. 이에 반해, 본 발명의 단백질 결합체는 비펩타이드성 중합체를 사용하므로, 결합부위의 조절이 용이하고, 비특이적 반응을 최소화하며, 정제가 용이한 장점을 갖는다.

<46>

본 발명의 단백질 결합체는 폴리에틸렌 글리콜만을 결합시킨 경우는 물론이고 폴리에틸렌 글리콜과 알부민을 결합시킨 종래 기술에 비해서도 월등히 우수한 안정성 및 활성을 나타낸다. 본 발명의 단백질 결합체를 공지의 기술에 의한 것과 비교하였을 때, 인간 성장호르몬에 분자량 40 kDa의 폴리에틸렌 글리콜만을 결합시킨 경우에는 성장호르몬의 혈중 반감기가 천연형에 비해 약 7배 증가하고, 인간 성장호르몬을 PEG 및 알부민과 결합시킨 경우에는 약 5배 증가한 반면, 성장호르몬에 폴리에틸렌 글리콜과 면역 글로불린을 모두 결합시킨 경우에는 혈중 반감기가 약 13배 정도로 획기적으로 증가하였다(실험예 1의 표 2 참조). 과립구 콜로니자극인자 및 그 유도체와 적혈구 생성인자를 인간 성장호르몬 대신 실험한 결과도 마찬가지로 결과를 보여주는데, PEG나 PEG-알부민을 결합시킨 경우에 비해 PEG-면역 글로불

린을 결합시킨 본 발명의 단백질 결합체가 평균체류시간(mean residence time; MRT)의 현저한 증가를 보이는 것은 물론이고, 활성 반감기도 공지기술에 비해 2배 내지 70배 이상 획기적으로 증가하였다(실험예 1의 표 3 내지 6 참조).

<47>

즉, 기존의 단백질 혈중 지속성을 증가시키기 위한 PEG 제형 중 지속성이 가장 높은 40 kD PEG를 수식한 단백질과의 비교는 물론, PEG-알부민을 결합시킨 단백질과의 비교시험에서도 본 발명의 단백질 결합체가 탁월한 혈중 지속성을 및 평균 체류시간을 나타내었다. 이와 같이, 본 발명의 단백질 결합체는 인체성장호르몬, 인터페론, 콜로니자극인자, 적혈구 생성인자 뿐만 아니라 돌연변이에 의한 콜로니 자극인자 유도체에 이르기까지 광범위한 범위의 생리활성 단백질에서 종래의 PEG 결합 단백질 또는 알부민 결합 단백질 보다 탁월한 혈중 안정성과 평균체류시간(MRT)을 나타내므로, 다양한 종류의 생리활성 폴리펩타이드의 지속형 제제 개발에 이용될 수 있다.

<48>

또한, 본 발명의 단백질 안정화 방법은 생체적합성을 갖는 비펩타이드성 중합체를 사용하므로, 단백질의 결합 방향을 다양하게 할 수 있으며, 결합부위의 조절이 용이하고, 비특이적 반응을 최소화하며, 독성이나 면역반응 유발과 같은 부작용이 없고, 정제가 용이한 장점을 갖는다. 공지의 단백질 안정성 증가 방법으로, 안정성이 가장 높은 것으로 알려진 40 kD PEG를 단독 수식하는 방법 및 PEG-알부민을 결합시키는 방법과 대비하였을 때, 본 발명의 단백질 안정화 방법은 수배 내지 수십배로 현저히 높은 혈중 안정성 및 평균체류시간을 나타낸다.

<49>

본 발명의 단백질 결합체 및 이를 이용한 단백질 안정화 방법은 호르몬, 사

이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 또는 수용체와 같은 다양한 생리활성 폴리펩타이드에 적용될 수 있다.

<50>

구체적으로 상기 생리활성 폴리펩타이드는 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 마크로파지 활성화 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사 인자, 종양 억제 인자, 전이 성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 오스테오제닉 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트로피오펙틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 췌장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 단일클론 항체 또는 폴리클론 항체 및 [Fab]', [Fab]'₂, scFv 같은 항체 유도체, 바이러스 유래 백신 항원 등 다양한 종류를 포함하며, 상기 폴리펩타이드의 천연형과 실질적으로 동등하거나 또는 증가된 기능, 활성 또는 안정성을 갖는 한, 일부 아미노산 잔기가 다른 아미노산으로 치환되거나 고 당쇄화된 유도체 또는 일부 아미노산 서열이 추가되거나 결실된 단편도 본 발명

의 생리활성 폴리펩타이드의 범위에 포함한다. 본 발명의 단백질 결합체는, 질병의 치료 또는 예방의 목적으로 인체에 투여될 때 투여 빈도가 높은 인간 성장호르몬, 인터페론-알파, 과립구 콜로니자극인자 또는 적혈구 생성인자 등에 특히 효과적으로 사용될 수 있다.

<51> 본 발명의 다른 측면으로서, 본 발명은 (a) 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린을 반응시켜 이들을 공유 결합으로 연결하는 단계; 및 (b) 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 안정성이 증가된 단백질 결합체 제조방법을 제공한다.

<52> 상기 생리활성 폴리펩타이드와 상기 면역 글로불린은 1:1 내지 10:1, 바람직하게는 1:1 내지 4:1의 몰비로 반응시킬 수 있다.

<53> 단계 (a)에서 상기 세 성분의 결합은 순차적으로 또는 동시에 일어날 수 있다. 예를 들어, 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단에 각각 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린을 결합시키는 경우에는, 생리활성 폴리펩타이드와 면역 글로불린 중 어느 하나를 먼저 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단과 결합시킨 후, 나머지 성분과 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단을 결합시키는 방식으로 순차적으로 반응을 진행하는 것이 목적하는 단백질 결합체 외의 부산물 생성을 최소화하는 데 유리하다.

<54> 단계 (a)는 (a1) 활성화된 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 면역 글로불

린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 공유결합으로 연결하는 단계; (a2) 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체와 결합된 면역 글로불린 또는 생리활성 폴리펩타이드 연결체를 분리하는 단계; 및 (a3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 비펩타이드성 중합체에 이미 결합되어 있지 않은 나머지 성분을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

<55> 상기에서, 단계 (a1)에서, 반응물이 생리활성 폴리펩타이드인 경우에 상기 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 최적 반응 몰비는 1:2.5 내지 1:5이고, 반응물이 면역 글로불린인 경우에 상기 면역 글로불린과 비펩타이드성 중합체의 최적 반응 몰비는 1:5 내지 1:10이다.

<56> 한편, 단계 (a3)의 반응물질로서 단계 (a2)에서 수득된 연결체: 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 연결체에 연결되어 있지 않은 나머지 성분과의 반응 몰비는 1: 0.5 내지 1: 20일 수 있고, 1:1 내지 1:3인 것이 바람직하다.

<57> 단계 (a1) 및 단계 (a3)의 반응은, 반응에 참가하는 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단 반응기의 종류를 고려하여 필요에 따라, 환원제의 존재 하에 수행될 수 있다. 바람직한 환원제로는 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3), 수소화붕소 나트륨, 디메탈아민 붕산염 및 피리딘 붕산염 등이 사용될 수 있다.

<58> 상기에서 단계 (a2) 또는 (b)는, 생성된 산물의 분자량 및 전하량과 같은 특

성을 고려하여 단백질의 분리에 사용되는 통상의 방법들 중에서 필요에 따라 적절히 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 생성된 연결체 단백질의 크기를 고려하여 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피를 포함하여 다양한 공지의 방법들을 적용할 수 있으며, 필요에 따라서는, 보다 높은 순도로 정제하기 위해 복수개의 서로 다른 방법을 조합하여 사용할 수 있다.

<59>

본 발명의 또 다른 측면으로서, 본 발명은 생리활성 폴리펩타이드, 면역 글로불린 및 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체를 포함하고 이들이 상호 공유결합으로 연결된 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 폴리펩타이드의 안정성이 증가된 지속성 단백질 약물 제제를 제공한다.

<60>

적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 지속성 단백질 약물 제제는 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 정제, 알약, 분말, 새세이 (sachet), 엘릭서 (elixir), 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀,

멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 지속성 단백질 약물 제제는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 주사제 형태로 투여될 수 있다.

<61> 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 본 발명의 단백질 결합체는 종래의 혈중 지속성이 낮은 생리활성 폴리펩타이드 보다 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 줄일수 있어 면역 유발 가능성도 낮을 것으로 보인다.

<62> 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 본 발명의 단백질 결합체의 실제 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 생리활성 폴리펩타이드의 종류에 따라 결정된다. 즉, 단백질 결합체에 포함된 생리활성 폴리펩타이드의 종류에 따라 당업계에서 질병의 치료 및 예방에 통상 사용되는 투여량을 기준으로 하여 결정하되, 투여 간격은 본 발명의 단백질 결합체가 나타내는 지속효과를 고려하여 상당히 연장될 수 있다.

<63> 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 좀더 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<64> <실시예 1> 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 결합체의 제조 I

<65>

단계 1 : 인간 성장호르몬과 PEG 연결체의 제조

<66>

양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌글리콜인 ALD-PEG-ALD(Shearwater Inc. 미국)를 인간 성장호르몬(hGH, 분자량 22 kDa)이 5 mg/ml 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 인간 성장 호르몬: PEG의 물비가 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:20이 되도록 첨가하였다. 환원제인 나트륨 시아노 보로 하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가하고, 4°C에서 천천히 교반 하면서 3시간동안 반응시켰다. 인간 성장호르몬의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG가 연결되고, PEG와 인간 성장호르몬이 1:1로 결합된 연결체를 얻기 위하여 반응혼합물을 가지고 슈퍼덱스(Superdex^R, Pharmacia, 미국) 크기 배제(size exclusion) 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 인간 성장호르몬-PEG를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 인간 성장호르몬, 미반응 PEG 및 2개의 인간 성장호르몬이 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 정제된 인간 성장호르몬-PEG를 5 mg/ml로 농축하였다. 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬: PEG의 최적 반응 물비는 1: 2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다.

<67>

단계 2: 인간 성장호르몬-PEG 연결체와 면역 글로불린의 결합체 형성

<68>

단계 1에서 정제된 인간 성장호르몬-PEG의 알데히드 반응기에 면역 글로불린을 결합시키기 위해 10 mM 인산염 완충용액에 용해된, 분자량 150 kDa의 면역 글로

불린 G(Immunoglobulin G; IgG)(녹십자, 한국)를 혼합하여 반응시켰다. 인간 성장 호르몬-PEG 연결체: 면역 글로불린의 물비를 1:1, 1:2, 1:4 및 1:8로 하여, 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 나트륨시아노보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도가 20 mM이 되도록 첨가하였다. 반응 혼합물을 4°C에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 결합 반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 정제하기 위하여 음이온 크로마토그래피를 수행하였다. 20 mM 트리스 완충용액(pH 7.5)으로 평형화시킨 컬럼(DEAE, Pharmacia, 미국)에 상기 반응물을 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 동일 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M \rightarrow 0.5 M) 방법으로 흘려 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 정제하고, 용합되지 않은 면역 글로불린 및 미반응 물질을 제거하였다. 얻어진 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 분획에 불순물로서 섞여 있는 소량의 미반응 면역 글로불린 및 인간 성장호르몬을 제거하기 위해 추가로 양이온 교환 수지 크로마토그래피를 수행하였다. 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 분획을 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5)으로 평형화시킨 컬럼(SP5PW, Waters, 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5) 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M \rightarrow 0.5 M) 방법으로 흘려 추가 정제를 실시하여 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다(도 1).

르몬-PEG-ALD:면역 글로불린의 최적 몰비는 1:2임이 확인되었다.

<70> <실시예 2> 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 결합체의 제조 II

<71> 단계 1 : 면역 글로불린과 PEG 연결체의 제조

<72> 양쪽 말단에 알데히드 반응기를 가진, 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 ALD-PEG-ALD(Shearwater Inc. 미국)를 면역 글로불린(IgG; 녹십자, 한국)이 15 mg/ml 농도로 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 면역 글로불린: PEG의 몰비가 각각 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 첨가하였다. 환원제인 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도 20 mM로 첨가한 후, 4°C에서 천천히 교반하면서 3시간동안 반응시켰다. 면역 글로불린의 아미노 말단 부위에 선택적으로 PEG: 면역 글로불린이 1:1로 결합한 연결체를 얻기 위하여 반응혼합물을 가지고 슈퍼덱스(Superdex^R, Pharmacia, 독일) 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 면역 글로불린-PEG-ALD를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 면역 글로불린, 미반응 PEG 및 2개의 면역 글로불린이 PEG와 연결된 이량체 부산물을 제거할 수 있었다. 정제된 면역 글로불린-PEG 연결체를 약 15 mg/ml로 농축하였다. 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 면역 글로불린: PEG의 최적 반응 몰비는 1:5 ~ 1:10 임이 확인되었다.

<73> 단계 2 : 면역 글로불린-PEG 연결체와 인간 성장호르몬의 결합체 형성

<74>

상기 단계 1에서 정제된 면역 글로불린-PEG 연결체에 인간 성장호르몬(hGH, 분자량 : 22 KDa)을 융합하기 위하여 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 인간 성장 호르몬을 사용하고, 면역 글로불린-PEG 연결체: 인간 성장호르몬의 물비를 각각 1:1, 1:1.5, 1:3 및 1:6이 되도록 하여 반응시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충 용액 상태로 만들었고, 환원제로서 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도가 20 mM이 되도록 넣어주었다. 반응 혼합물을 4°C에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응을 진행시켰다. 반응 후 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 정제하여 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 면역 글로불린-PEG-인간성장호르몬 단백질 결합체를 순수하게 분리하였다.

<75>

<실시예 3> 인터페론 알파-PEG-면역 글로불린 결합체의 제조

<76>

인간 성장 호르몬 대신에 인터페론 알파 2b(IFN α 2b, 분자량 20 kDa)를 사용하고, IFN α 2b와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 물비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1에서와 동일한 방법으로 IFN- α -PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 제조 및 정제하였다.

<77>

<실시예 4> 인간 과립구 콜로니자극인자-PEG-면역 글로불린 결합체의 제조

<78>

인간 성장 호르몬 대신에 인간 과립구 콜로니 자극인자(G-CSF)를 사용하고, G-CSF와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 물비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시

에 1과 동일한 방법으로 G-CSF-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<79> 한편, 천연형 G-CSF의 17번째 아미노산이 세린으로 치환된 유도체(¹⁷S-G-CSF)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 G-CSF 유도체-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<80> <실시예 5> 인간 적혈구생성인자-PEG-면역 글로불린 결합체의 제조

<81> 인간 성장 호르몬 대신 인간 적혈구생성인자(Erythropoietin; EPO)를 사용하고, EPO와 ALD-PEG-ALD(분자량 3.4 kDa)의 몰비를 1:5로 하는 것을 제외하고는 실시예 1과와 동일한 방법으로 EPO-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<82> <실시예 6> 반응기의 종류를 달리하는 PEG를 이용한 단백질 결합체의 제조

<83> 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 석시니미딜 프로피오네이트(succinimidyl propionate; SPA)인 PEG를 사용하여 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 다음과 같이 제조하였다. 인간 성장호르몬 10 mg이 용해된 100 mM 인산염 완충용액에 양쪽 말단에 SPA 반응기를 갖는, 분자량 3.4 kDa의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 SPA-PEG-SPA(Shearwater Inc. 미국)를 인간 성장호르몬: PEG의 몰비가 각각 1:1, 1:2.5, 1:5, 1:10 및 1:20이 되도록 정량하여 첨가하고, 상온에서 천

천히 교반하면서 2시간동안 반응시켰다. 인간 성장호르몬의 라이신 잔기의 아미노 그룹 부위에 선택적으로 PEG를 연결하고, PEG와 인간 성장호르몬이 1:1로 결합한 연결체를 얻기 위하여, 반응 혼합물을 가지고 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 실시하였다. 용출액으로 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)을 사용하여 인간 성장호르몬-PEG 연결체를 정제하였고, PEG와 결합하지 않은 인간 성장호르몬, 미반응 PEG 및 2개의 인간 성장호르몬이 PEG의 양쪽 말단에 모두 연결된 이량체 부산물을 제거하였다. 면역 글로불린을 융합하기 위하여 정제된 인간 성장호르몬-PEG 연결체를 약 5 mg/ml로 농축한 후, 실시예 1과 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 결합체를 제조하였다. 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬: PEG의 최적 반응 몰비는 1:2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다.

<84> 한편, 상기와 동일한 방법을 수행하되, 양쪽 말단의 반응 그룹이 모두 N-하이드록시석시니미딜(N-hydroxysuccinimidyl; NHS)인 PEG(NHS-PEG-NHS; Shearwater Inc, 미국)를 사용하여 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린의 생성을 확인하였다.

<85> <실시예 7> 분자량이 다른 PEG를 이용한 단백질 결합체의 제조

<86> 분자량이 10,000 달톤이고, 양쪽 말단에 알데히드 화학적 반응기를 가진 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 ALD-PEG-ALD(Shearwater Inc. 미국)를 사용하여 실시예 1의 단계 1과 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-PEG 연결체를 제조 및 정제하였다. 이때, 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬: PEG

의 최적 몰비는 1: 2.5 ~ 1:5 임이 확인되었다. 정제된 인간 성장호르몬-PEG 연결체를 약 5 mg/ml이 되도록 농축한 후, 이를 이용하여 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 인간 성장호르몬-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체를 제조 및 정제하였다.

<87> <비교예 1> PEG-인간 성장 호르몬 연결체의 제조

<88> 100 mM 인산칼륨 완충 용액(pH 6.0)에 인간 성장 호르몬 5 mg을 넣어 최종 부피 5 ml가 되도록 준비한 후, PEG의 분자량이 40 kDa인 활성화된 메톡시-PEG-알데히드(Shearwater사, 미국)를 인간 성장호르몬: PEG의 몰비가 1:4가 되도록 상기 용액에 첨가하였다. 상기 반응 용액에 환원제인 NaCNBH_3 (Sigma사, 미국)를 최종 농도 20 mM이 되도록 첨가한 후, 4°C에서 18시간 동안 서서히 교반시키면서 반응시켰다. 인간 성장호르몬에 반응하지 않은 PEG를 불활성화시키기 위해 에탄올아민을 최종농도가 50 mM이 되도록 첨가하였다.

<89> 반응하지 않은 PEG를 분리하기 위해 세파텍스 G-25 컬럼(Pharmacia사)을 이용하였다. 먼저 2 칼럼 부피(column volume; CV)의 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 컬럼을 평형화시킨 후 반응 혼합물을 점적하였다. 파장 260 nm의 자외부 흡광계로 검출하며 동일한 완충 용액으로 용출하면 크기가 더 큰 PEG로 수식된 인간성장호르몬이 먼저 용출되어 나오고 반응하지 않은 PEG는 나중에 용출되는데, 미 반응 PEG를 제거하였다.

<90>

상기에서 얻은 용출액으로부터 PEG로 수식된 인간 성장 호르몬을 더욱 순수하게 분리, 정제하기 위해 다음을 수행하였다. 3 ml의 폴리왁스 엘피(PolyWAX LP, Polywax Inc., 미국) 컬럼을 10 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 평형화시켰다. PEG화된 반응 혼합물을 1ml/분의 유속으로 컬럼상에 부가한 후, 15 ml의 평형 완충 용액으로 세척하였다. 30 ml의 1 M NaCl 완충 용액으로 30분 동안 0에서 100 %까지의 염 농도 구배 방법을 이용하여, 트리-, 디-, 모노-PEG가 결합된 인간 성장호르몬 순서대로 용출시켰다.

<91>

더욱 순수한 모노-PEG 결합 인간 성장호르몬을 분리하기 위해 상기에서 수득한 모노-PEG와 인간 성장호르몬의 연결체 용출 분획을 가지고 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 10 mM 인산나트륨 완충 용액(pH 7.0)으로 평형화시킨 슈퍼덱스 200(Superdex 200, Pharmacia사)에 상기 용출액을 농축하여 점적하였으며, 동일한 완충 용액으로 용출하였다. 유속은 1 ml/분으로 흘려주었다. 트리-, 디-PEG이 결합된 인간 성장호르몬은 모노-PEG가 결합된 인간 성장호르몬보다 용출 시간이 상대적으로 빠르므로 이를 제거하여 모노-PEG이 결합된 인간 성장호르몬만을 순수 분리하였다.

<92>

동일한 방법으로 인터페론 알파, 파립구 콜로니자극인자의 아미노 말단에 40kDa PEG가 결합된 PEG-인터페론, PEG-¹⁷S-G-CSF 유도체 및 PEG-콜로니자극인자 연결체를 제조하였다.

<93>

<비교예 2> 알부민-인간 성장 호르몬 결합체의 제조

<94>

실시에 1의 단계 1에서 정제된 인간 성장호르몬-PEG 연결체에 알부민을 결합시키기 위하여 10 mM 인산염 완충용액에 용해된 인간 알부민(Human Serum Albumin : HSA, 분자량 대략 67 kDa)(녹십자, 한국)을 첨가하여 인간 성장호르몬-PEG 연결체:알부민의 물비를 각각 1:1, 1:2, 1:4 및 1:8로 만든 후 반응시켰다. 반응액을 100 mM 인산염 완충용액 상태로 만들었고, 환원제로서 나트륨 시아노 보로하이드라이드(NaCNBH_3)를 최종 농도가 20 mM이 되도록 넣어주었다. 반응 혼합물을 4°C에서 20 시간 동안 천천히 교반하면서 반응시켰다. 반응성이 가장 좋고 이량체 등과 같은 부산물이 적은 인간 성장호르몬-PEG 연결체:알부민의 최적 반응 물비는 1:2임이 확인되었다.

<95>

융합 반응 후 미반응 물질 및 부산물을 제거하고 생성된 인간 성장호르몬-PEG-알부민 단백질 결합체를 정제하기 위하여 슈퍼덱스 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 각 반응 혼합물을 농축한 후 10 mM 아세트산 나트륨 완충용액을 이용하여, 유속 2.5 ml/분으로 컬럼에 통과시켜, 결합되지 않은 알부민 및 미반응 물질을 제거하고 인간 성장호르몬-PEG-알부민 단백질 결합체만을 정제하였다. 얻어진 인간 성장호르몬-PEG-알부민 단백질 결합체 분획에는 불순물로서 소량의 미반응 알부민 및 인간 성장호르몬 이량체가 섞여 있으므로 이의 제거를 위해 추가로 양이온 교환 수지 크로마토그래피를 수행하였다. 인간 성장호르몬-PEG-알부민 단백질 결합체 분획을 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5)으로 평형화시킨 컬럼(SP5PW,

Waters, 미국)에 넣고 1 M 염화나트륨(NaCl)을 포함한 10 mM 아세트산 나트륨(pH 4.5) 완충액을 직선 농도구배(염화나트륨 농도 0 M → 0.5 M) 방법으로 흘려 추가 정제를 행하였고 인간 성장호르몬-PEG-알부민 단백질 결합체를 순수하게 획득하였다.

<96> 동일한 방법으로 인터페론 알파, G-CSF에 각각 알부민이 결합된 인터페론 알파-PEG-알부민, G-CSF-PEG-알부민 및 ¹⁷S-G-CSF 유도체-PEG-알부민 단백질 결합체를 제조하였다.

<97> <실험예 1> 단백질 결합체의 확인 및 정량

<98> (1) 단백질 결합체의 확인

<99> 상기 실시예들에서 제조한 단백질 결합체의 확인은 4-20 % 농도구배 겔을 사용한 SDS-PAGE 및 ELISA(R&D system, 미국) 방법으로 확인하였다.

<100> hGH, hGH-PEG, IFN 및 IFN-PEG에 DTT(Dithiothreitol)를 각각 50 mM의 양으로 첨가한 후 SDS-PAGE를 실시하였고, IgG, hGH-PEG-IgG 및 IFN-PEG-IgG은 DTT 없이 전개시켰다.

<101> 각 단백질의 SDS-PAGE 결과를 도 2 및 3에 나타내었다. 도 2는 커플링 반응 후 생성된 hGH-PEG-IgG 단백질 결합체를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이고, 도 3은 커플링 반응 후 생성된 IFN-PEG-IgG 단백질 결합체를 확인하기 위한 SDS-PAGE 결과이다. 왼쪽에 나열한 숫자는 분자량 마커로서 단위는 kDa 이다.

<102>

도 2 및 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 겔보기 분자량은 hGH-PEG-IgG 단백질 결합체의 경우 약 170 kDa으로 나타났다. 그러나, IgG가 결합된 단백질 결합체는 그 분자량 차이를 SDS-PAGE 상에서 구별하기 어렵기 때문에, hGH-PEG-IgG 및 IgG를 각각 DTT로 처리하여 환원시킴으로써 경쇄 및 중쇄로 분리하였고, 각각이 커플링된 상태를 SDS-PAGE 상에서 확인하였다(도 4).

<103>

IgG에 DTT를 처리하면, 분자량이 작은 것부터 경쇄, 중쇄가 순서대로 분리되고, hGH에 결합된 IgG는 상기 경쇄, 중쇄의 2 종류 절편에 각각 hGH-PEG(3.4 kDa) 연결체의 크기만큼 증가된 위치에 밴드가 나타났다. hGH이 결합된 경쇄는 중쇄보다 약간 작은 위치에, hGH이 결합된 중쇄는 약 80K 달톤 위치에 밴드를 형성하였다. 상기 결과로부터 경쇄와 중쇄 사이에 커플링 선택성이 없고 IgG와 hGH가 1:1로 결합한 것을 알 수 있다. 커플링 반응에서 hGH-PEG 연결체: IgG 의 몰비를 1:1 미만으로 조절하면 IgG 하나에 2개의 hGH가 커플링 될 수 있기 때문에 이량체 형성에 의한 활성 증가 효과를 갖게 된다.

<104>

(2) 단백질 결합체의 정량

<105>

실시예에서 제조한 각각의 단백질 결합체의 양은 크기 배제 크로마토그래피(컬럼: Superdex, 용출액: 10 mM 칼륨-포스페이트 완충액(pH 6.0)) 상에서 피크면적을 대조구와 비교하여 환산하는 방법으로 계산하였다. 이미 정량되어 있는 hGH, IFN, G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, EPO 및 IgG로 각각 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후

농도와 피크면적 간의 환산계수를 측정하였다. 각 단백질 결합체 일정량을 사용하여 동일한 크기 배제 크로마토그래피를 실시하고, 여기서 얻어진 피크면적에서 면역 글로불린에 해당하는 피크면적을 뺀 값을 각 단백질 결합체에 존재하는 생리활성 단백질의 정량 값으로 하였다.

<106> 크로마토그래피 방법 이외에 ELISA(R&D system, 미국) 방법을 병행하였다. IgG가 생리활성 폴리펩타이드에 결합되면 생리활성 폴리펩타이드의 항체로 그 양을 정량할 때, 항체와 상기 폴리펩타이드와의 결합이 저해되어 크로마토그래피에 의해 계산되는 실제 값보다 적게 정량되는데, hGH-PEG-IgG의 경우에는 ELISA에 의해 측정된 값이 대략 실제 값의 약 30 % 정도인 것으로 확인되었다.

<107> (3) 단백질 결합체의 순도 및 질량 확인

<108> 각각의 실시예에서 얻은 단백질 결합체에 대해 크기 배제 크로마토그래피를 실시한 후 280 nm에서 흡광했을 때, hGH-PEG-IgG, IFN-PEG-IgG, G-CSF 및(¹⁷Ser-G-CSF)-PEG-IgG는 분자량 170,000-180,000 달톤인 물질의 체류시간대에서 단일피크를 나타내었다. 한편, EPO-PEG-IgG의 경우에는 분자량 200,000 달톤에 해당하는 위치에서 단일피크가 확인되었다.

<109> 각 정제된 시료의 정확한 분자량을 확인하기 위하여 각 시료의 질량을 MALDI-TOF(Voyager DE-STR, Applied Biosystems, USA) 초고속 질량분석기를 이용하여 분석하였다. 매트릭스로는 시나핀 산(sinapinic acid)을 사용하였으며, 각각의

시험용 시료 0.5 μ l를 시료 슬라이드에 도포하여 자연 건조한 후, 동량의 매트릭스 용액을 첨가한 다음 다시 자연 건조시켜 이온원(ion source)에 도입하였다. 검출은 포지티브 방식으로 리니어 모드 TOF 방식 장치를 사용하여 수행되었으며, 이온은 지연된 이온 추출(DE)를 사용하는 분할 추출 공급원에서, 지연된 추출 시간은 750 nsec/1500 nsec로, 약 2.5kV의 전체 전위차를 통해 가속화하였다. 인간성장호르몬-PEG-면역 글로불린 융합체의 질량분석 결과를 하기 표 1 및 도 5에 나타내었다. 그 결과, 수득된 hGH-PEG-IgG 단백질 결합체의 순도는 90% 이상이었고, 이론치와 매우 가까운 분자량을 나타내었다. 또한, 면역 글로불린에 성장호르몬이 1:1로 결합된 형태인 것으로 나타났다.

<110>

【표 1】

면역 글로불린 단백질 결합체의 질량 분석 결과

| | 이론치(kDa) | 측정치(kDa) |
|--|----------|----------|
| 인간성장호르몬-PEG-IgG(실시예 1) | 175.4 | 175.4 |
| 인터페론-알파-PEG-IgG(실시예 3) | 172.6 | 172.6 |
| 과립구 콜로니자극인자-PEG-IgG(실시예 4) | 172.1 | 173.0 |
| ¹⁷ S-G-CSF 유도체-PEG-IgG(실시예 4) | 171.9 | 172.2 |
| 적혈구생성촉진인자-PEG-IgG(실시예 5) | 185.4 | 183.0 |

<111>

<실험예 2> 약물동력학 조사

<112>

각 군당 5 마리의 SD 랫트(Rat)에 천연형 생리활성 단백질(대조군)과 상기 실시예 및 비교예에서 제조한 단백질 결합체, PEG 결합단백질 및 알부민 단백질 결합체의 혈액내 안정성 및 약물동력학 계수를 비교하였다. 대조군 및 PEG-연결체,

알부민 단백질 결합체 및 본 발명의 단백질 결합체(시험군)를 각 100 ug/kg씩 피하 주사한 후, 대조군은 주사 후 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 및 96시간 후에 채혈하였고, 시험군은 주사 후 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 및 320 시간 후에 채혈하였다. 헤파린을 함유하는 튜브에 혈액시료를 모아 응고를 방지하였고, 에펜도르프 고속 마이크로 원심분리기에서 5분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 혈장 내 단백질 양은 각 생리활성 단백질에 대한 항체를 이용하여 ELISA 방법으로 측정하였다.

<113>

인간성장호르몬, 인터페론, 콜로니자극인자 및 적혈구생성인자의 천연형 단백질과 PEG-연결체, 알부민 및 면역 글로불린이 각각 PEG를 매개체로 하여 결합된 단백질 결합체의 약물동력학을 하기 표 2 내지 표 6에 나타내었다. 하기 표에서 Tmax는 최고 약물 농도에 도달하는 시간을, $T_{1/2}$ 는 약물의 혈중 반감기를, MRT(mean residence time)는 약물분자의 평균적인 체내 체류시간을 의미한다.

<114>

【표 2】

인간성장호르몬의 약물동력학

| | 천연형 인간 성장호르몬 | hGH-40K PEG (비교예 1) | hGH-PEG-알부민 (비교예 2) | hGH-PEG-IgG (실시예 1) |
|------------------|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Tmax (hr) | 1.0 | 12 | 12 | 12 |
| $T_{1/2}$ (hr) | 1.1 | 7.7 | 5.9 | 13.9 |
| MRT (hr) | 2.1 | 18.2 | 13.0 | 19.0 |

<115>

【표 3】

인터페론 알파의 약물동력학

| | 천연형 IFN-α | IFN-α -40K PEG (비교예 1) | IFN-α -PEG-알부민 (비교예 2) | IFN-α -PEG-IgG (실시예 3) |
|-------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T _{max} (hr) | 1.0 | 30 | 12 | 30 |
| T _{1/2} (hr) | 1.7 | 35.8 | 17.1 | 76.7 |
| MRT (hr) | 2.1 | 71.5 | 32.5 | 121.0 |

<116>

【표 4】

과립구 콜로니자극인자의 약물동력학

| | 천연형 G-CSF | G-CSF-40K PEG (비교예 1) | G-CSF-PEG-알부민 (비교예 2) | G-CSF-PEG-IgG (실시예 4) |
|-------------------------|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| T _{max} (hr) | 2.0 | 12 | 12 | 12 |
| T _{1/2} (hr) | 2.8 | 4.8 | 5.2 | 8.4 |
| MRT (hr) | 5.2 | 24.5 | 25.0 | 35.7 |

<117>

【표 5】

콜로니 자극인자 ¹⁷S-G-CSF 유도체의 약물동력학

| | 천연형 ¹⁷ S-G-CSF 유도체 | ¹⁷ S-G-CSF유도체 -40K PEG (비교예 1) | ¹⁷ S-G-CSF 유도체 -PEG-알부민 (비교예 2) | ¹⁷ S-G-CSF 유도체 -PEG-IgG (실시예 4) |
|-------------------------|-------------------------------------|---|--|--|
| T _{max} (hr) | 2.0 | 24 | 24 | 48 |
| T _{1/2} (hr) | 2.9 | 4.3 | 6.4 | 7.2 |
| MRT (hr) | 5.8 | 24.4 | 25.1 | 42.6 |

<118>

【표 6】

적혈구 생성인자의 약물동력학

| | 천연형 EPO | 고 당쇄화 EPO (Darbepoetin-a) | EPO-PEG-IgG (실시예 5) |
|-------------------------|---------|-------------------------------|------------------------|
| T _{max} (hr) | 6.0 | 12 | 48 |
| T _{1/2} (hr) | 9.4 | 18.4 | 52.2 |
| MRT (hr) | 21.7 | 36.7 | 95.6 |

<119>

상기 표 2 및 도 6의 약물 동력학 그래프에서 알 수 있듯이, hGH-PEG-IgG 단백질 결합체의 경우 혈중 반감기는 13.9시간으로서 천연형 hGH에 비해 약 13배 증가하였으며, 이는 비교예에서 제조한 40 kDa PEG-hGH의 반감기인 7.7 시간보다 약 2배 증가한 것이다. PEG의 한쪽 말단에 면역 글로불린 대신 알부민이 결합된 hGH-PEG-알부민의 경우 반감기가 5.9 시간으로, 본 발명의 단백질 결합체가 월등히 우수한 혈중 반감기를 나타내었다.

<120>

또한, 표 3을 살펴보면, 인터페론 알파의 경우도 인체성장호르몬과 비슷한 결과를 보여주고 있으나, 본 발명의 단백질 결합체가 나타내는 혈중 반감기의 증가 효과는 훨씬 더 큼을 확인할 수 있다. 천연형 인터페론 알파는 반감기가 1.7 시간이고 40 kD PEG를 결합시킨 경우는 반감기가 35.8시간으로 증가하였으며, 본 발명의 면역 글로불린 대신 알부민을 결합시킨 경우에는 17.1 시간으로 나타났다. 이에 비해 본 발명의 단백질 결합체의 경우에는 혈중 반감기가 무려 76.7시간으로 획기적으로 증가하였고, 이러한 결과로부터 인터페론 치료시의 투여 빈도를 획기적으로 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

<121>

표 4와 표 5에서 보듯이, 과립구 콜로니자극인자와 그의 유도체에 대한 혈중 지속성도 상기 인체성장호르몬 및 인터페론을 이용한 실험결과와 유사한 경향을 보여준다. 천연형 과립구 콜로니자극인자와 그의 유도체 보다 40 kD PEG가 수식된

단백질과 알부민 결합시킨 경우가 천연형 보다 반감기가 길게 나타났지만, 이들 모두에 비하더라도 본 발명의 단백질 결합체가 가장 긴 혈중 반감기를 나타내었다. 단백질의 혈중 지속성을 증가시키는 면역 글로불린의 효과는 천연형 생리활성단백질 뿐만 아니라 일부 아미노산을 변형시킨 유도체에서도 천연형과 비슷한 정도임을 확인할 수 있었고, 이러한 결과로부터 본 발명의 방법이 다른 단백질의 유도체에서도 유사한 효과를 나타낼 것임을 쉽게 예상할 수 있다.

<122>

도 7과 표 6에서 보듯이, 당쇄화가 되어 있는 천연형 단백질인 적혈구 생성인자 (erythropoietin; EPO)에 대해서도 본 발명의 단백질 결합체의 혈중 반감기 증가효과가 확인되었다. 즉, 천연형 적혈구 생성인자의 혈중 반감기가 9.4시간이고, EPO를 고 당쇄화시켜 혈중 안정성을 높인 Darbepoetin- α (Aranesp, Amgen, USA)의 경우는 반감기가 18.4시간으로 증가하는 것으로 나타났다. 적혈구 생성인자에 면역 글로불린을 결합시킨 EPO-PEG-IgG 결합체의 경우에는 혈중 반감기가 무려 52.2시간으로 획기적으로 증가하였다.

<123>

상기 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 면역 글로불린 및 비펩타이드성 중합체와 공유결합된 단백질 결합체들은 천연형 단백질들에 비해 수배에서 수십배 이상 증가된 혈중 반감기를 나타내었다.

<124>

특히, 기존의 단백질 혈중 지속성을 증가시키기 위한 PEG 제형 중 지속성이 가장 높은 40 kD PEG를 수식한 단백질과의 비교에서도 면역 글로불린 단백질 결합체가 월등하게 높은 혈중 안정성을 나타내는 것을 보여주고 있다. 또한, 면역 글로불린 대신 알부민을 결합시킨 단백질 결합체와의 비교시험에서도 본 발명의 단백

질 결합체가 탁월한 혈중 안정성을 보여줌으로써 본 발명의 단백질 결합체가 지속형 단백질 약물 제제 개발에 효과적임을 확인할 수 있었다. 점 돌연변이에 의한 콜로니 자극인자 유도체까지 광범위한 범위의 단백질에서 종래의 PEG 결합 단백질 또는 알부민 단백질 결합체보다 탁월한 혈중 안정성과 평균체류시간(MRT)을 나타내는 결과를 볼 때, 본 발명의 단백질 결합체에 의한 안정성 및 지속성 증가 효과는 다른 생리활성펩티드에도 적용 가능함을 알 수 있다.

<125>

한편, 비펩타이드성 중합체로서 10 kD PEG를 사용한 hGH-PEG-IgG 단백질 결합체(실시예 7)을 사용하여 상기와 동일한 방법으로 반감기를 측정했을 때, 반감기는 14.7 시간으로 나타나 분자량 3.4 kD인 PEG를 사용한 단백질 결합체의 반감기인 13.9 시간보다 다소 증가하였다. 비펩타이드성 중합체인 PEG의 분자량 증가에 따라 혈중 반감기가 다소 증가하지만, 단백질 결합체의 혈중 안정성 및 지속성 증가의 주된 요인은 비펩타이드성 중합체의 분자량보다는 결합된 면역 글로불린에 의한 효과인 것으로 보인다. PEG의 반응 그룹을 변화시킨 경우에도 겔보기 분자량과 혈중 반감기가 알데하이드 반응기를 갖는 PEG를 사용한 경우와 유사한 양상을 보였다.

<126>

<실험예 3> 세포 내 활성 측정

<127>

(1) 인간 성장호르몬 단백질 결합체의 세포 내 활성비교

<128>

인간 성장호르몬 단백질 결합체의 세포 내 활성비교를 위하여 hGH-PEG-IgG, 40 kD PEG-hGH 및 hGH-PEG-알부민의 세포 내 활성을 비교 시험하였다.

<129>

인간 성장호르몬 의존성 유사 분열을 하는 세포인 랫트 결절 림프종(rat node lymphoma) 세포주인 Nb2 세포(European Collection of Cell Cultures(ECACC) #97041101)를 이용하여 세포 내 활성도를 시험관내 분석을 하였다.

<130>

Nb2 세포를 배양액(Fisher`s medium)에 10 % 소 태아 혈청(FBS, fetal bovine serum), 0.075 % NaCO_3 , 0.05 mM 2-메르캅토에탄올 및 2 mM 글루타민을 첨가한 배지에서 배양한 후, 10 % 소 태아 혈청을 제외한 동일한 배지에서 24시간 동안 더 배양하였다. 배양액에서 배양된 세포의 수를 세어 약 20,000개의 세포를 96 웰 플레이트의 각 웰에 넣은 후, hGH-PEG-IgG, 40 kDa PEG-hGH 및 hGH- PEG-알부민, 대조군인 국제 표준품(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC), 천연형 인간 성장 호르몬(hM-hGH)을 각각 희석하여 농도별로 첨가한 후, 37°C, CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이 후 세포의 성장 정도(각 well 의 세포 수)를 측정하기 위해 세포 염색약(cell titer 96 Aqueous One Solution(promega사, 미국))을 각 웰에 25 μl 씩 넣은 후, 4시간 동안 배양하였다. 이 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 각 시료의 역가를 계산하고, 표 7에 나타내었다.

<131>

【표 7】

인간성장호르몬의 시험관내 활성 분석

| | 농도(ng/ml) | 비활성* (U/mg) | 천연형 HM-hGH에 대한 상대적 활성 (%) |
|---|-----------|----------------|------------------------------|
| 천연형 인간성장호르몬 | 100 | 2.71E+06 | 100 |
| 인간성장호르몬 (NIBSC 국제표준품) | 100 | 2.58E+06 | 95.2 |
| 인간성장호르몬 - 40K PEG | 100 | 0.206E+06 | 7.6 |
| 인간성장호르몬 - PEG-알부민 | 100 | 0.141E+06 | 5.2 |
| 인간성장호르몬 -PEG-면역 글로불린 | 100 | 0.86E+06 | 31.7 |
| 비활성*=1/ED50 x 106 (ED50: 최대 세포 성장의 50 %를 나타내는 단백질의 양) | | | |

<132>

표 7에서 볼 수 있듯이, 시험에 사용한 모든 시료는 인간 성장 호르몬 감수성 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 보아 모두 활성이 있음을 알 수 있고, PEG에 의해 수식된 인간 성장 호르몬은 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여 떨어지는 것으로 나타났다. 다른 단백질인 인터페론 알파의 경우 12 kD PEG가 결합된 경우 25%, 40 kD PEG가 결합된 경우 약 7% 정도의 시험관내 활성을 갖는다고 보고되어 있다(P.Bailon 등, Bioconjugate Chem. 2001. 12: 195~202). 인간 성장호르몬의 경우도 수식된 PEG의 크기가 클수록 그 활성도가 점차 떨어지는데, 40 kDa의 PEG가 수식된 인간 성장호르몬의 경우 천연형 인간 성장호르몬 활성도의 약 7.6 %를 나타내는 것으로 나타났다. 또한 알부민을 결합시킨 경우 인간 성장호르몬의 시험관내 활성은 천연형 대비 약 5.2% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 면역 글로불린을 인간성장호르몬에 결합시킨 경우는 천연형 대비 상대적 활성도가 30 % 이상으로 획기적으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역 글로불린 융합체의 생체내 약효가 매우 뛰어날 것을 기대할 수 있다. 본 발명의 면역 글로불린 단백질 결합체의 경우 면역 글로불린에

의한 혈중 안정성 증가와 면역 글로불린이 수용체와의 결합력을 보존시키는 역할을 도와주거나 또는 비펩타이드성 중합체의 사용으로 인해 형성된 공간적 여유에 의해 단백질의 활성이 증가한 것으로 보인다. 이러한 작용은 다른 생리활성 단백질들의 면역 글로불린 단백질 결합체에서도 유사할 것으로 기대된다.

<133>

(2) 인터페론 알파 단백질 결합체의 세포내 활성비교

<134>

인터페론 알파 단백질 결합체의 세포내 활성비교를 위하여 IFN-PEG-IgG(실시예 3), 40 kD PEG-IFN(비교예 1) 및 인터페론 알파-PEG-알부민(비교예 2)의 항바이러스 활성을 수포성 구내염 바이러스로 포화시킨 마딘-다비 (Madin-Darby) 소 신장 세포 (MDBK, Madin Darby Bovine Kidney, ATCC CCL-22)를 사용하는 세포배양 생검으로 측정하였다. 이 때, 폴리에틸렌 글리콜이 결합되지 않은 인터페론 알파 2b(NIBSC 인터페론)를 대조군으로 사용하였다.

<135>

MDBK 세포를 MEM(minimum essential medium: JBI)에 10 % FBS 및 1 % 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 배지에서 37℃, 5 % CO₂의 조건으로 배양하였다. 측정하고자 하는 시료와 표준물질(NIBSC 인터페론)을 일정 농도로 세포 배양 배지에 희석하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 μ l씩 분주한 다음, 상기에서 배양된 세포를 플라스크에서 떼어내어 시료가 분주되어 있는 플레이트에 100 μ l씩 가한 후, 37℃, 5 % CO₂ 조건에서 약 1시간 가량 배양하였다. 1시간 후 바이러스 농도가 5 ~ 7 x 10³ PFU 가 되도록 조절된 VSV(Vesicular stomatitis virus)를 50 μ l씩 플레이트에

첨가시켜 주었다. 음성 대조군으로 시료 및 표준 물질을 넣지 않고 세포와 바이러스만을 넣은 웰을, 양성 대조군으로 바이러스 희석 용액을 넣지 않고 세포만 넣은 웰을 만들었고, 모든 시험군은 37℃, 5 % CO₂ 의 조건에서 약 16 ~ 20 시간 추가로 배양하였다.

<136> 배양액을 제거하고 살아있는 세포를 염색하기 위하여 뉴트랄 레드(neutral red) 용액 100 μ l씩을 첨가하여 준 뒤, 37℃, 5 % CO₂ 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후 100 % 에탄올과 1 % 아세트산을 1:1로 섞어서 100 μ l씩 넣어주었다. 염색된 세포를 잘 흔들어서 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군을 블랭크(blank)로 하고, 양성 대조군을 세포 성장 100 %로 간주하여 50 % 세포 성장 부분의 농도(ED₅₀)를 계산하였다.

<137> 【표 8】

인터페론 알파의 시험관내 활성 분석

| | 농도(ng/ml) | ED ₅₀ (IU/mg) | 천연형 인터페론에 대한 상대적 활성 (%) |
|----------------------|-----------|--------------------------|-------------------------|
| 천연형 인터페론 알파 | 100 | 4.24E+08 | 100 |
| 인터페론 알파 - 40K PEG | 100 | 2.04E+07 | 4.8 |
| 인터페론 알파 - PEG-알부민 | 100 | 2.21E+07 | 5.2 |
| 인터페론 알파 -PEG-면역 글로불린 | 100 | 4.75E+07 | 11.2 |

<138> 표 8에서 보는 바와 같이, PEG에 의해 수식된 인터페론은 그 활성도가 수식

되지 않은 것에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있다. 특히, 수식된 PEG의 크기가 클수록 혈중 안정성은 증가하지만 상대적으로 활성도가 점차 떨어짐을 알 수 있고, 40 kD의 PEG가 수식된 경우 표준형 인터페론의 활성도의 약 4.8 %를 갖는 것으로 나타났다. 인터페론 알파의 경우 12 kD PEG가 수식된 경우 25%, 40 kD PEG가 수식된 경우 약 7% 정도의 시험관내 활성을 갖는다는 보고가 이미 되어 있다(P.Bailon 등, Bioconjugate Chem. 2001. 12: 195~202). 즉 PEG가 크게 되면 혈중 반감기는 길어지게 되나 상대적으로 약효가 급격하게 감소되므로, 혈중 반감기가 길면서 약효도 뛰어난 물질 개발이 매우 필요하다. 한편, 알부민을 결합시킨 경우 인터페론 알파의 시험관내 활성은 천연형 대비 약 5.2% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 면역글로불린을 인터페론 알파에 결합시킨 경우는 천연형 대비 상대적 활성도가 11.2 % 이상으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역글로불린 단백질 결합체의 생체내 약효가 매우 뛰어날 것을 기대 할 수 있다.

<139> 이와 같은 결과로부터, 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역 글로불린, 및 인터페론을 포함하는 단백질 결합체의 생체 내에서 약리 효과가 매우 뛰어날 것으로 기대할 수 있다.

<140> (3) 과립구 콜로니자극인자 단백질 결합체의 세포내 활성비교

<141> 과립구 콜로니자극인자 유도체 단백질 결합체의 세포내 활성비교를 위하여,

천연형 G-CSF(Filgrastim), ^{17}S -G-CSF 유도체, 20 kD PEG-G-CSF(Neulasta, USA), 40 kD PEG- ^{17}S -G-CSF 유도체, ^{17}S -G-CSF 유도체-PEG-알부민 및 ^{17}S -G-CSF 유도체-PEG-IgG의 세포 내 활성을 측정하였다.

<142> 우선, 인간 골수 기원의 세포주인 HL-60 (ATCC CCL-240, Promyelocytic leukemia patient/36 yr old Caucasian female)을 10%의 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하다가, 세포의 숫자를 약 2.2×10^5 세포/ml이 되도록 조정 한 후, DMSO (dimethylsulfoxide, culture grade/SIGMA)를 최종 1.25% (v/v)가 되도록 첨가하였다. 위의 세포주를 96 웰 플레이트 (Corning/low evaporation 96 well plate)에 90 μl 씩 넣어서 웰 당 세포가 약 2×10^4 개가 되도록 한 후, 5% CO_2 가 공급되는 37°C 배양기에서 약 72시간 동안 배양하였다.

<143> 알엔디 (R & D systems)사의 G-CSF ELISA 키트를 이용하여 농도가 결정되어진 각 시료들을 동일한 농도가 되도록 적정한 비율로 RPMI 1640으로 희석하여 최종 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였고, 이를 다시 RPMI 1640으로 1/2로 희석하는 것을 19회 반복하였다.

<144> 이렇게 만들어진 시료를 배양 중인 HL-60 세포주의 각 웰에 10 μl 씩 가하여, 최종 농도가 1000 ng/ml로부터 연속적으로 반감되도록 하였다. 위에서 제조한 단백질 시료들을 처리한 세포주는 37°C 배양기에서 72시간을 다시 배양하였다.

<145> 배양후 세포주의 증가 정도를 알아보기 위하여, 프로메가 (PROMEGA)사의

CellTiter96™ (Cat. No. G4100)을 이용하여, 증가한 세포주의 숫자를 670 nm 파장에
서의 흡광도로 결정하여 분석을 완료하였다.

<146>

【표 9】

파립구 콜로니자극인자 유도체의 시험관내 활성 분석

| | ED ₅₀ (IU/ml) | G-CSF에 대한 상대적 활성 (%) |
|---|--------------------------|-------------------------|
| 천연형 G-CSF (Filgrastim) | 0.30 | 100 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체 | 0.26 | 115 |
| 20K PEG - G-CSF (Neulasta) | 1.20 | 25 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체 - 40K PEG | 10.0 | < 10.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체 - PEG-알부민 | 1.30 | 23.0 |
| ¹⁷ Ser-G-CSF 유도체 -PEG-면역 글로불린 | 0.43 | 69.0 |

<147>

표 9에서 보는 바와 같이 아미노산을 변화시킨 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체의 면역 단
백질 결합체도 천연형 단백질의 단백질 결합체와 비슷한 효과를 보여주고 있다.
PEG에 의해 수식된 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체는 그 활성도가 수식되지 않은 것에 비하여
혈중 반감기는 증가하지만 효력이 떨어짐을 이미 확인한 바 있다 (대한민국 특허
출원번호2003- 17867호). 특히, 수식된 PEG의 크기가 클수록 혈중 안정성은 증가하
지만 상대적으로 활성도가 점차 떨어짐을 알 수 있고, 40 kD의 PEG가 수식된 경우
¹⁷Ser-G-CSF 유도체의 활성도의 약 10% 이하로 매우 낮은 것으로 나타났다. 즉 PEG

가 크게 되면 혈중 반감기는 길어지게 되나 상대적으로 약효가 급격하게 감소되므로, 혈중 반감기가 길면서 약효도 뛰어난 물질 개발이 매우 필요하다. 한편, 알부민을 결합시킨 경우 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체의 시험관내 활성은 천연형 대비 약 23% 정도로 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 면역글로불린을 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체에 결합시킨 경우는 천연형 대비 상대적 활성도가 69 % 이상으로 높아짐을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 혈중 반감기의 획기적 증가와 더불어 면역글로불린과 $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ 유도체의 결합체의 생체내 약효가 매우 뛰어날 것을 기대할 수 있다.

<148>

<실험예 4> 모델 동물에서 생체내 활성 측정

<149>

(1) 인간 성장호르몬 단백질 결합체의 생체내 활성비교

<150>

뇌하수체가 제거된 5주령의 수컷 랫트(hypsectomized Sprague Dawley rat, SLC사, 일본)를 각 실험군마다 10마리씩 이용하여 몸무게 증가 시험을 하였으며, 이를 통해 인간성장호르몬-PEG-면역 글로불린 결합체, 인간성장호르몬- 40K PEG 연결체 및 천연형 인간성장호르몬의 생체내 활성도를 측정하였다. 용매 대조군과 천연형 인간성장호르몬, 그리고 각각의 인간성장호르몬-PEG-면역 글로불린, 인간성장호르몬- 40K PEG 연결체를 랫트의 경배부 피하에 아래의 표 10과 같은 투여농도 및 용량으로 26G 주사기(1 ml, (주)한국백신)로 투여하였다. 투여 전 및 투여 16시간 이후 체중을 측정하였고, 최종 투여 24시간 이후에 에테르 마취로 치사시켜 육안으로 뇌하수체의 잔존유무를 검사하여 뇌하수체의 잔존물이 관찰된 개체는 결과로부터

터 제외시켰다.

<151>

【표 10】

모델 동물에서의 인간성장호르몬 활성 시험 조건

| 그룹 | 투여약물 | 일평균투여량 | 투여용량 | 투여방법 |
|----|-------------------------|------------|----------------------------|---------------------|
| 1 | 용매대조군 | - | PBS(0.5ml) | 1회/하루, 12일간 매일투여 |
| 2 | 천연형 인간성장호르몬 | 30 μ g | 60 mIU (30 μ g/회) | 1회/하루, 12일간 매일투여 |
| 3 | 인간성장호르몬 -40KDa PEG | 30 μ g | 360 mIU (180 μ g/회) | 1회/주, 2회 투여 |
| 4 | 인간성장호르몬 -PEG-면역 글로불린 | 30 μ g | 360 mIU (180 μ g/회) | 1회/주, 2회 투여 |
| 5 | 인간성장호르몬 -PEG-면역 글로불린 | 10 μ g | 120 mIU (60 μ g/회) | 1회/주, 2회 투여 |

<152>

각 시료의 투여 후 몸무게 증감의 결과를 도 8에 나타내었다. 표준품으로 사용한 천연형 인간 성장호르몬이 지속적으로 생체내 활성을 갖기 위해서는 매일 투여해야 하므로, 천연형 인간 성장호르몬을 하루에 1회씩 12일간 매일 투여하였고, 실험군에서 투여기간 동안 몸무게의 증가가 관찰되었다. 인간성장호르몬-40KDa PEG 연결체를 주 1회 투여하였을 경우에는, 투여 후 3일까지 지속적으로 몸무게가 증가하였고, 3일 이후에는 몸무게 증가율이 둔화되었다. 이러한 결과는 인간성장호르몬-40KDa PEG 연결체가 천연형에 비해 훨씬 긴 혈중 반감기와 시험관내에서 높은 활성을 보이는 실험에 1 및 2의 결과로부터 예상되는 것과 일치한다. 특히, 인간성장호르몬-PEG-면역 글로불린 결합체의 경우에는 효력이 월등하게 높았고, 천연형 투여용량의 1/3 용량으로 주 1회 투여하였을 때에도 천연형과 동등 이

상의 효력을 나타내어 생체내 효력이 천연형에 비해 3배 이상 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는, 본 발명의 단백질 결합체가 매일 주사를 맞아야 하는 천연형 인간성장호르몬의 단점을 극복하면서 생리 활성 단백질의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키면서도 상당히 높은 생체내 활성을 유지함을 보여준다.

<153> (2) 과립구 콜로니자극인자 유도체 단백질 결합체의 생체내 활성 비교

<154> 17번째 아미노산을 세린으로 치환한 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체에 대해서도 본 발명의 단백질 결합체가 상기한 효과를 나타내는지를 확인하기 위해, 천연형 G-CSF 및 시판 중인 20kD PEG 결합된 G-CSF와 생체내 활성을 비교하였다. 본 발명의 ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체는 용매(20mM sodium phosphate, 1% Gly, 0.25% mannitol, pH 7.0)에 용해하여 사용하였다. 비교 물질로는 천연형의 메티오닐 G-CSF(methionyl G-CSF; Filgrastim, Amgen, USA)와 20kD의 PEG가 결합된 PEG-G-CSF(Neulasta, Amgen, USA)를 위와 동일한 용매에 희석하여 사용하였다. 정상 마우스 시험에서는 7주령의 웅성 ICR 마우스를 샘타코 Bio(한국)에서 구입하여 일주일 동안의 순화 기간을 거친 후 시험에 사용하였다. 시험 개시시 체중 범위는 ICR의 경우 30-35g이었다. 사육실은 온도 22± 3℃, 상대습도 55± 5%, 환기횟수 10-12회/hr, 명암주기 12시간, 조도 150~200 룩스(lux)로 유지하였으며 순화기간 및 시험기간 중에는 실험동물용 고형사료(삼양사 배합사료)를 섭취시켰고, 음수는 수돗물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 각 실험군당 5마리의 마우스에 대해

실험하였고, 정상마우스에서 복합항암제와 각 시료들을 하기 표 11과 같은 용량과 방법으로 투여하였다. 호중구 감소증 (Neutropenia) 모델 동물은 사이클로헥사마이드(CPA; Sigma, 미국) 130mg/kg, 독소루비신(DXR; Sigma, 미국) 4.5mg/kg 및 빈크리스틴(VCR; Sigma, 미국) 1mg/kg을 ICR 마우스의 복강내로 단회 투여하여 만들었다. 무처치군은 항암제를 투여하지 않아 호중구 수가 감소하지 않는 정상군을 의미하며, 용매대조군은 항암제를 투여하여 호중구 수를 낮추고 약물 대신 부형제 용매만 투여한 군이다. 항암제 투여 후 1일째부터 5일째까지 매일 오전 10시경에 천연형 G-CSF를 100 μ g/kg/day 용량으로 임상에서 보편적으로 사용되는 피하주사 방법으로 투여하였다. 지속형 ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-면역 글로불린 결합체와 20 kD PEG-G-CSF (Neulasta, Amgen, USA)는 항암제 투여 후 1일째 하루만 투여하였는데 투여용량은 매일 투여용량의 2배량으로 (200 μ g/kg/day) 5일치를 한꺼번에 투여하였다. 시료 채취는 항암제 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 8일째에 안와 채혈을 실시하였다. 채혈시간은 약물투여 6시간 후인 오후 4시경에 하였으며, 0.3 ~ 0.5ml의 혈액을 안와 정맥총에서 채혈하였다. 자동혈구측정기로 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈소판(Platelet) 수를 측정하였다. 또한, 혈액 일부를 취해 혈액 도말 표본을 제작하여 김사(Giemsa) 염색을 행한 후 각 혈구들을 분별계수하여 얻어진 호중구(neutrophil)의 비율에 의거하여, 호중구수를 하기 수학적 2에 의해 산출하였다.

【수학적 2】

$$\text{호중구수 (개/mm}^3\text{)} = \text{전 백혈구수 (개/mm}^3\text{)} \times \text{호중구비율 (\%)} \times 1/100$$

<156>

통계처리는 혈구수 및 체중에 대하여 Student's t-test를 사용하여 무처치군과 용매 대조군에 대해 ¹⁷Ser-G-CSF 유도체-PEG-면역 글로불린 군과의 통계적 유의성을 검증하였다.

<157>

【표 11】

모델 동물에서의 호중구 증가 활성 비교 시험조건

| 그룹 | 투여약물 | 일평균 투여량 (kg/day) | 총 투여용량 | 투여방법 |
|----|---|---------------------|---------------|--------------------|
| 1 | 무처치군 | - | PBS(0.5ml) | 1회/하루, 5일간 매일투여 |
| 2 | 용매대조군 | - | PBS(0.5ml) | 1회/하루, 5일간 매일투여 |
| 3 | 천연형 G-CSF (Filgrastim) | 100μg | 500μg/kg/5회 | 1회/하루, 5일간 매일투여 |
| 4 | 20K PEG- G-CSF (Neulasta) | 200μg | 1,000μg/kg/1회 | 1회 투여 |
| 5 | ¹⁷ S-G-CSF유도체-PEG-면역 글로불린 | 200μg | 1,000μg/kg/1회 | 1회 투여 |

<158>

각 시료의 투여 후 호중구 회복효과를 도 9에 나타내었다. 표준품으로 사용한 천연형 G-CSF는 하루에 1회씩 5일간 매일 투여하였을 경우 투여기간 동안 서서히 호중구 수가 증가하여 5일째 최고치에 도달하였다. 효력 비교를 위한 대조군으로서 사용한 20kD PEG-G-CSF는 매일 투여 용량의 2배 용량을 1회만 투여하였는데, 매일 투여한 G-CSF의 2/3 정도의 생체내 효력을 나타낸 반면 ¹⁷S-G-CSF유도체-PEG-

면역 글로불린 결합체의 효력은 20kD PEG-G-CSF에 비하여 3배 이상 높은 생체내 활성을 나타내었다. 또한, 본 발명의 단백질 결합체는 매일 투여한 G-CSF 보다는 2배 이상 높은 호중구 회복효과를 나타내었는데, 이러한 결과는 ^{17}S -G-CSF유도체-PEG-면역 글로불린 단백질 결합체가 천연형에 비해 훨씬 긴 혈중 반감기와 높은 시험관내 활성을 갖는다는 실험 결과로부터 유추되는 것과 일치한다. 상기 결과로부터, 천연형 단백질을 이용한 경우와 마찬가지로 아미노산을 변화시킨 유도체 단백질에서도 면역 글로불린 및 PEG의 공유결합에 의한 본 발명의 효과가 동일하게 나타남을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 단백질 결합체는 매일 주사를 맞아야 하는 천연형 G-CSF의 단점을 극복하면서 생리 활성 단백질의 혈중 반감기를 획기적으로 증가시키고 생체내 활성을 획기적으로 높이는 목적을 동시에 충족시키는 지속형 제형으로서 효과적으로 이용될 수 있다.

【발명의 효과】

<159> 본 발명의 단백질 결합체는 폴리펩타이드 약물의 혈중 반감기 증가가 기존에 보고된 어떠한 변형 단백질보다도 높고, 기존 지속형 제형의 가장 큰 단점인 역가의 감소를 극복하여, 종래 가장 효과가 좋은 것으로 알려진 알부민을 이용한 경우보다 월등한 혈중 지속성과 생체내 활성을 가질 뿐만 아니라, 면역 반응 유발의 위험도 거의 없어, 단백질 약물의 지속형 제재 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 단백질 약물의 지속형 제제는 잦은 주사로 인한 환자의 고통을 감소시

킬 수 있고, 활성 폴리펩타이드의 혈중 농도를 지속적으로 유지하여 약효를 안정적으로 나타낼 수 있다.

<160>

또한, 본 발명의 단백질 결합체 제조방법에 따르면, 발현 시스템 확립의 어려움, 천연형과 상이한 당쇄화, 면역반응 유발, 단백질 융합 방향성의 제한 등 유전자 조작에 의한 융합 단백질 생산방식의 단점과, 반응의 비특이성으로 인한 낮은 수율 및 결합제로 사용되는 화학물질의 독성 문제 등 화학적 결합 방식의 문제점을 극복하여, 증가된 혈중 반감기와 활성을 갖는 단백질 약물을 용이하고 경제적인 방식으로 제공할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 서로 공유결합으로 연결되어 있으며, 상기 폴리펩타이드의 생체내 지속성이 증가된 단백질 결합체.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단 반응기를 통해 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린과 각각 공유결합으로 연결되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

하나의 면역 글로불린에, 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체가 2개 이상 공유결합으로 연결되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 면역 글로불린이 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 5】

제4항에 있어서,

상기 면역 글로불린이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 6】

제4항에 있어서,

상기 면역 글로불린이 인간 면역 글로불린인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 7】

제2항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시나미드(succinamide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 동일하거나 서로 다른 반응기인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 8】

제7항에 있어서,

상기 석시나미드 유도체가 석시니미딜 프로피오네이트, 석시니미딜 카르복시메틸, 하이드록시 석시니미딜 또는 석시니미딜 카보네이트인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 9】

제7항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 양 말단에 반응 알데히드 그룹의 반응기를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 10】

제1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단이 각각 상기 면역 글로불린과 상기 생리활성 폴리펩타이드의 아미노 말단, 라이신 잔기, 히스티딘 잔기 또는 시스테인 잔기의 유리 반응기에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 11】

제1항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리 비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, PLGA, 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 12】

제11항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 13】

제1항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 마크로파지 활성화 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 피사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 피사 인자, 종양 억제 인자, 전이 성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스무타제, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 오스테오제닉 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오 펩틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 위장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 단일클론 항체 또는 폴리클론 항체 및 [Fab]', [Fab]'₂, scFv 같은 항체 유도체, 및 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 15】

제14항에 있어서,

상기 생리 활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 인터페론-알파, 파립구 콜로니자

극인자 또는 적혈구 생성인자인 것을 특징으로 하는 단백질 결합체.

【청구항 16】

(a) 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체, 생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린을 반응시켜 이들을 공유결합으로 연결하는 단계; 및

(c) 생리활성 폴리펩타이드, 비펩타이드성 중합체 및 면역 글로불린이 공유결합으로 연결된 결합체를 분리하는 단계를 포함하는, 제1항의 단백질 결합체 제조방법.

【청구항 17】

제16항에 있어서,

단계 (a)는

(a1) 활성화된 비펩타이드성 중합체의 한쪽 말단에 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 어느 하나를 공유결합으로 연결하는 단계;

(a2) 반응 혼합물로부터 비펩타이드성 중합체와 결합된 면역 글로불린 또는 생리활성 폴리펩타이드 연결체를 분리하는 단계; 및

(a3) 분리된 연결체의 비펩타이드성 중합체의 다른 쪽 말단에 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 비펩타이드성 중합체에 이미 결합되어 있지 않은 나머지 성분을 공유결합으로 연결하여 비펩타이드성 중합체의 양쪽 말단이 각각 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 단백질 결합체를 생성하는 단계를 포함하는 방법.

【청구항 18】

제17항에 있어서,

단계 (a1)에서 생리활성 폴리펩타이드와 비펩타이드성 중합체의 반응 몰비가 1:2.5 내지 1:5인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 19】

제17항에 있어서,

단계 (a1)에서 면역 글로불린과 비펩타이드성 중합체의 반응 몰비가 1:5 내지 1:10인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 20】

제17항에 있어서,

단계 (a3)의 반응물질인 단계 (a2)에서 수득된 연결체: 면역 글로불린 및 생리활성 폴리펩타이드 중 연결체에 연결되어 있지 않은 나머지 성분과의 반응 몰비가 1:1 내지 1:3인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 21】

제17항에 있어서,

단계 (a1) 및 단계 (a3)의 반응이 환원제의 존재 하에 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 22】

제21항에 있어서,

상기 환원제가 나트륨 시아노보로하이드라이드(NaCNBH_3), 수소화 붕소나트륨, 디메틸아민 붕산염 또는 피리딘 붕산염인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 23】

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 단백질 결합체 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 지속성 단백질 약물 제제.

【청구항 24】

생리활성 폴리펩타이드 및 면역 글로불린을, 양 말단에 반응기를 갖는 비펩타이드성 중합체에 공유결합으로 연결시키는 것을 포함하는, 생리활성 폴리펩타이드의 생체내 지속성을 향상시키는 방법.

【청구항 25】

제24항에 있어서,

하나의 면역 글로불린에, 생리활성 폴리펩타이드와 결합된 비펩타이드성 중합체 2개 이상을 공유결합으로 연결시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 26】

제24항에 있어서,

상기 면역 글로불린이 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 27】

제26항에 있어서,

상기 면역 글로불린이 인간 면역 글로불린인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 28】

제24항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체의 양 말단 반응기가 반응 알데히드 그룹, 프로피온 알데히드 그룹, 말레이미드(maleimide) 그룹 및 석시나미드(succinamide) 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 동일하거나 서로 다른 반응기인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 29】

제24항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 단독 중합체, 폴리프로필렌 글리콜 단독 중합체, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리옥시 에틸화 폴리올, 폴리 비닐 알콜, 폴리사카라이드, 덱스트란, 폴리비닐 에틸 에테르, pLGA, 생분해성 고분자 중합체, 지질 중합체, 키틴류, 히아루론산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 30】

제29항에 있어서,

상기 비펩타이드성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 31】

제24항에 있어서,

상기 생리 활성 폴리펩타이드가 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사 조절인자, 혈액인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질 및 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 32】

제31항에 있어서,

상기 생리활성 폴리펩타이드가 인간 성장 호르몬, 성장 호르몬 방출 호르몬, 성장 호르몬 방출 펩타이드, 인터페론, 콜로니 자극 인자, 인터루킨, 마크로파지 활성화 인자, 마크로파지 펩타이드, B세포 인자, T세포 인자, 단백질 A, 알러지 억제 인자, 세포 괴사 당단백질, 면역독소, 림포독소, 종양 괴사 인자, 종양 억제 인자, 전이 성장 인자, 알파-1 안티트립신, 알부민, 아포리포단백질-E, 에리트로포이에틴, 고 당쇄화 에리트로포이에틴, 인자 VII, 인자 VIII, 인자 IX, 플라즈미노젠 활성화 인자, 유로키나제, 스트렙토키나제, 단백질 C, C-반응성 단백질, 레닌 억제제, 콜라게나제 억제제, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 오스테오제닉 성장 인자, 골 형성 촉진 단백질, 칼시토닌, 인슐린, 아트리오 펩틴, 연골 유도 인자, 결합 조직 활성화인자, 여포 자극 호르몬, 황체 형성 호르몬, 황체 형성 호르몬 방출 호르몬, 신경 성장 인자, 부갑상선 호르몬, 릴렉신, 씨크레틴, 소마토메딘, 인슐린-유사 성장 인자, 부신 피질 호르몬, 글루카곤, 콜레시스토키닌, 위장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드, 코티코트로핀 방출 인자, 갑상선 자극 호르몬, 단일클론 항체 또는 폴리클론 항체 및 [Fab]', [Fab]'2, scFv 같은 항체 유도체, 및 바이러스 유래 백신 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 33】

제32항에 있어서,

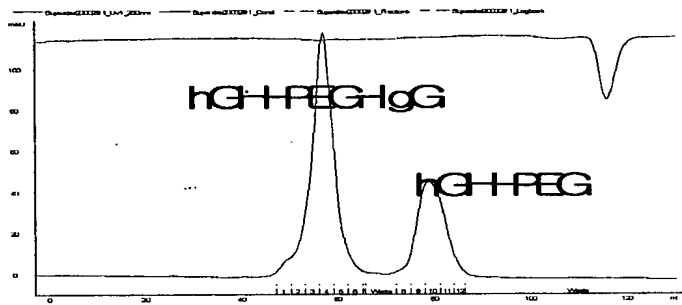
상기 생리 활성 폴리펩타이드가 인간 성장호르몬, 인터페론-알파, 파립구 콜로니자



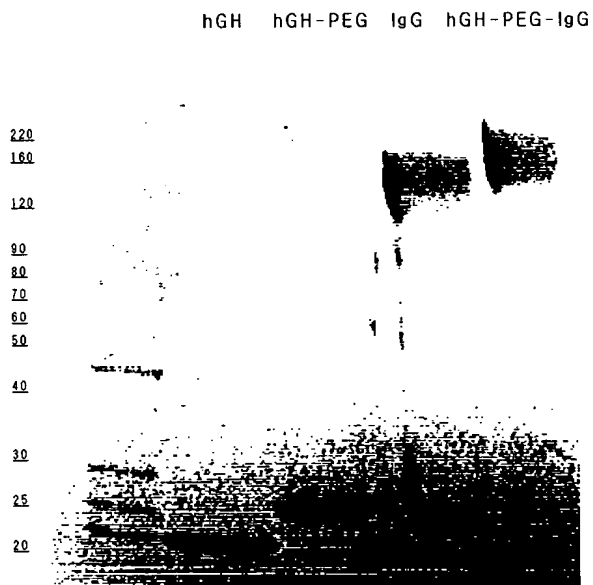
극인자 또는 적혈구 생성인자인 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

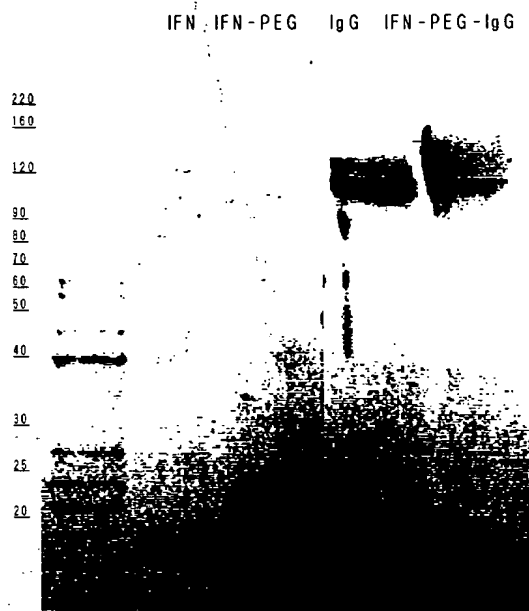
【도 1】



【도 2】

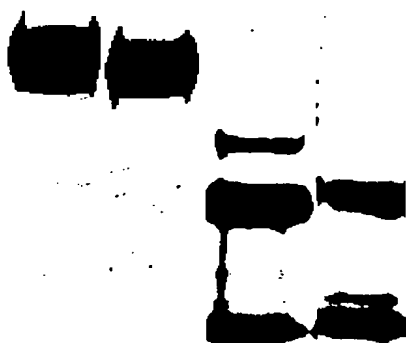


【도 3】



【도 4】

[DTT 이 처리] [DTT 처리]
hGH-PEG-IgG IgG hGH-PEG-IgG IgG

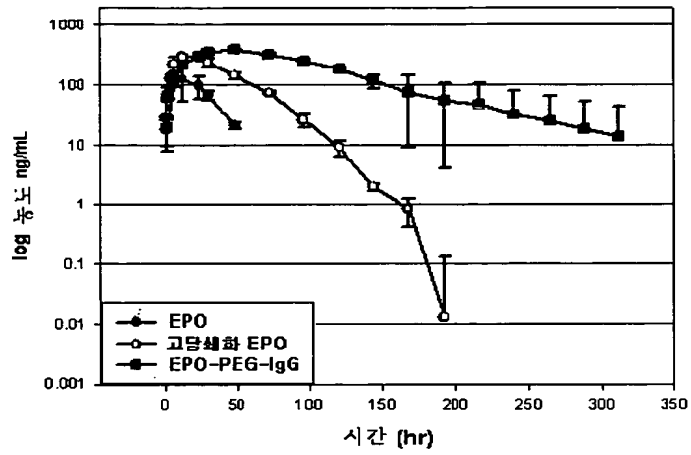


Mass spectrum showing relative intensity (Y-axis, 0 to 100) versus mass-to-charge ratio (X-axis, 0 to 2500 m/z). The spectrum displays several characteristic peaks, with the base peak at m/z 1820.05.

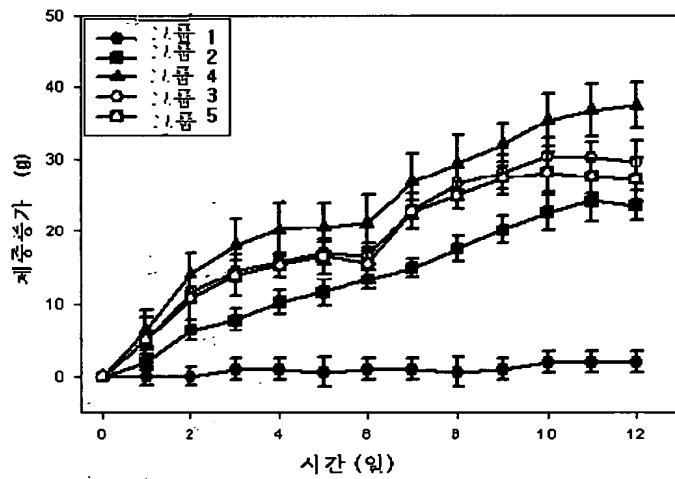
| m/z | Relative Intensity (%) |
|---------|------------------------|
| 1820.05 | 100.00 |
| 1774.66 | 86.18 |
| 1500.80 | 80.00 |
| 1305.94 | 70.00 |
| 1138.07 | 75.00 |
| 1067.24 | 70.00 |
| 943.31 | 60.00 |
| 852.21 | 50.00 |
| 722.10 | 40.00 |
| 708.64 | 35.00 |
| 634.79 | 30.00 |
| 503.04 | 20.00 |
| 475.66 | 15.00 |
| 432.21 | 10.00 |
| 399.04 | 10.00 |
| 180.35 | 10.00 |
| 160.35 | 10.00 |
| 139.07 | 10.00 |
| 126.43 | 10.00 |
| 752.13 | 10.00 |
| 2644.13 | 10.00 |

| 시간 (hr) | hGH (log ng/mL) | 40k-PEG-hGH (log ng/mL) | hGH-PEG-IgG (log ng/mL) | hGH-PEG-25μmAb (log ng/mL) |
|---------|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 0 | ~50 | ~100 | ~50 | ~20 |
| 1 | ~300 | ~100 | ~100 | ~30 |
| 2 | ~200 | ~100 | ~100 | ~20 |
| 4 | ~100 | ~100 | ~10 | ~10 |
| 6 | ~100 | ~100 | ~1.5 | ~8 |
| 12 | ~20 | ~12 | - | ~1.5 |
| 24 | ~6 | ~2 | - | - |
| 30 | ~4 | - | - | - |

【도 7】



【도 8】



【도 9】

